

を行い、回復寛解期 (remission) に IFN β の継続的皮内・筋肉内投与を行う方法が、最も一般的な治療法として選択されている。しかし IFN β が十分治療効果を示さない症例 (nonresponder) や副作用で使用出来ない症例も多い^{28,40,43)}。すなわち MS は均一な疾患ではなく、多様な病態を呈する疾患群である可能性が高い。事実 MS は臨床経過から再発寛解型 (relapsing-remitting MS ; RRMS), 二次進行型 (secondary-progressive MS ; SPMS), 一次進行型 (primary-progressive MS ; PPMS), 病巣分布から脳型 (conventional MS : CMS), 視神経脊髄型 (opticospinal MS : OSMS), IFN β 治療反応性から反応型 (responder MS : RMS), 不応型 (non-responder MS : NRMS) に分類される。また病理学的には T 細胞浸潤, 抗体沈着, オリゴデンドロサイトアポトーシス (apoptosis) 所見により 4 型に分類され²⁰⁾, 早期からの軸索傷害進行も注目されている³⁸⁾。

近年, MS の免疫病態多様性 (heterogeneity) を解析する手段として, 遺伝子アレイ (DNA microarray/ GeneChip) が用いられている。ゲノムプロジェクト完了によりヒト全遺伝子塩基配列が解読され, 遺伝子アレイを用いて個々の細胞における数万遺伝子 (ヒト全遺伝子約 30,000) の発現情報を, 包括的・網羅的・系統的に解析可能になった。RNA レベルの発現解析をトランスクリプトーム (transcriptome) 解析, タンパク質レベルの発現解析をプロテオーム (proteome) 解析と呼ぶ。このような網羅的発現解析 (global expression analysis) の手法により, 従来の研究方法では予期しなかった遺伝子群の MS 病態形成における役割が, 次々明らかにされた³³⁾。さらに薬物反応性遺伝子の変動を経時的に解析し, 遺伝学的個人差に応じた薬物反応性や副作用を予知することが可能になり, 薬理ゲノミクス (pharmacogenomics) の分野は急成長を遂げた。本稿ではマイクロアレイによる MS の免疫病態・薬物反応性の解析に関する最近の知見を概説する。

I. マイクロアレイ解析の基本原則

遺伝子アレイはスライドガラスやナイロン膜などの基盤・支持体上に, 数千・万の cDNA やオリゴヌクレオチド (oligonucleotide) が固定されているチップである。cDNA をスポッターで基盤上にスポットする DNA マイクロアレイ (microarray) と, 基盤上で直接高密度 oligonucleotide をフォトリソグラフ合成する GeneChip (Affymetrix) に大別される。スライドガラスをマイクロアレイ (microarray), ナイロン膜をマクロアレイ (macroarray) と総称する。遺伝子アレイ解析は発現解析アレイ・タイピングアレイ (SNP, CGH など)

・タイピングアレイ (ChIP-chip など) に分類されるが, 本稿では発現解析アレイに焦点を絞って言及する。

まず, 遺伝子発現レベルが異なる 2 種類以上の細胞・組織, 例えば IFN β 投与前後の細胞から mRNA (total RNA でも可能) を抽出し増幅する (図 1)。DNA マイクロアレイでは別々の蛍光色素 (Cy3 赤, Cy5 緑) で標識した cDNA または cRNA を作成して, 同一チップ上で競合的ハイブリダイゼーションを行う (2 色法)。GeneChip では *in vitro* transcription 法で cDNA から biotin 標識 cRNA を作成, fragment に切断してハイブリダイゼーションを行い, streptavidin-phycoerythrin (SAPE) を添加して蛍光標識する (1 色法)。GeneChip は 1 サンプルに 1 アレイが必要で, アレイ間の比較になる。どちらの場合もスキャナーで蛍光シグナルを検出, 得られたデータを正規化 (normalization) し, 統計学的解析 (R 解析: www.cran.r-project.org など) を行い, サンプル間の遺伝子発現プロフィール (gene expression profile) を比較する。したがって出発点の RNA の質 (quality) が結果に非常に影響する。有意な発現差異を示す遺伝子に関しては real-time RT-PCR 解析を行い, 定量的に検証 (validation) することが重要である。同定した遺伝子の機能や構造に関する情報 (annotation) に関しては, Web 上でデータベース (NCBI の Entrez など) を検索する (表 1)。すでに様々な遺伝子発現データが MIAME (minimum information about a microarray experiment) 形式に従い, 公共データベース Gene Expression Omnibus (GEO) に登録されており, 自由にダウンロード出来る。末梢血リンパ球 (peripheral blood mononuclear cells : PBMC) の解析の問題点としては, 遺伝子発現レベルが年齢・性・喫煙・飲酒・常用薬・嗜好品・精神的ストレスや採血時刻 (日内変動) の影響を受けることである (interindividual and intraindividual variation)⁴⁵⁾。脳組織の解析では, 死後脳凍結までに要する時間 (RNA degradation time) が問題であるが, 組織の pH が参考になる。

サンプルが多数の場合はデータセットの要素特性を分類するため, 解析ソフト (GeneSpring : Silicon Genetics-Agilent など) を用いて, 階層的クラスタ解析 (hierarchical clustering analysis) を行う⁴⁾。すなわちサンプルに関する事前情報なしに (教師なし法 unsupervised method と呼ぶ), 同じ遺伝子発現制御を受けていると考えられる類似発現パターン遺伝子やサンプルを, クラスタ (グループ・クラスとも言う) に分類し, 系統樹・樹状図 (dendrogram) および発現レベルの二次元マトリックスを用いて表示する⁴⁾。非階層的クラスタ解析には k-means (KM) clustering や self-

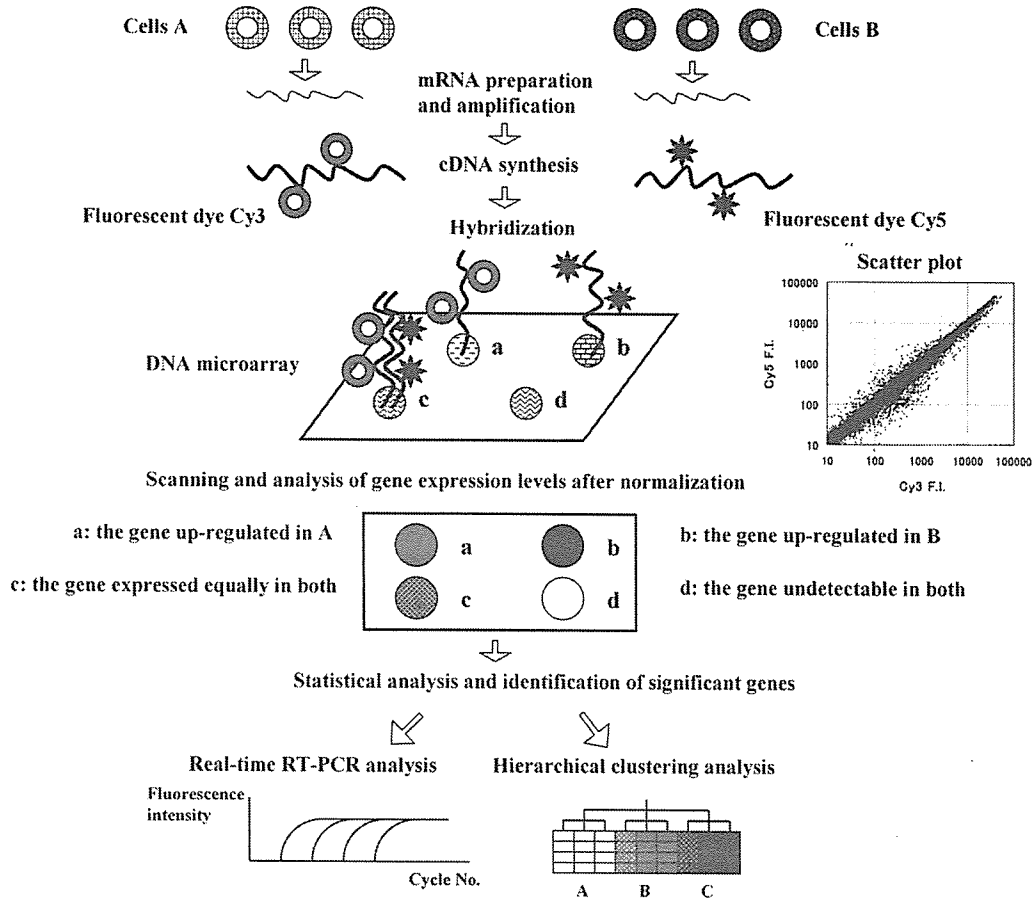


図1 マイクロアレイ解析の概要

2種類の細胞(A, B)からmRNAを抽出増幅し、別々の蛍光色素(Cy3, Cy5)でラベルしたcDNA probeを作成して、多数のcDNA(またはoligonucleotide)がスポットされたスライドガラス(DNA microarray)上で競合的ハイブリダイゼーションを行う(2色法)。スキャナーで蛍光シグナルを検出し、データを正規化して統計学的検定を行い、サンプル間の遺伝子発現プロファイル(gene expression profile)を比較する。A, Bの遺伝子発現パターンが類似している場合には、蛍光シグナルがスカッタープロット(Cy3 vs Cy5 scatter plot)で直線上に分布する。マイクロアレイ解析で有意な発現差異を呈すると判定された遺伝子に関しては、real-time RT-PCR法でmRNAを定量し検証する必要がある。サンプル数が多数の場合は階層的クラスター(hierarchical clustering)解析を行い、類似発現パターンを示す遺伝子やサンプルをグループ・クラスに分類する。

organization map (SOM) 法がある。またクラスターを特徴づける指標遺伝子(discriminator genes)を抽出し、その要素を圧縮して三次元に投射する主成分解析(principal component analysis: PCA)を行う²⁶⁾。さらに指標遺伝子の抽出に用いたデータを training set として機械学習することにより(教師あり法 supervised method と呼ぶ)、新規のデータセットにおけるクラスターを識別する超平面(hyperplane)を同定する方法であるサポートベクターマシン(support vector machine: SVM)解析を行う¹⁰⁾。

II. DNA マイクロアレイによる多発性硬化症免疫病態の解析(表2)

1. MS 脳組織の遺伝子発現解析

Whitney らは初めて cDNA microarray を用いて、MS 急性期炎症性病巣と正常様白質(normal-appearing white matter: NAWM)を比較し、前者における interferon-regulatory factor IRF-2 と 5-lipoxygenase の発現上昇を報告した^{46,47)}。Chabas らは cDNA ライブラリー網羅的シーケンス解析により、MS 脳における

表1 バイオインフォマティクスデータベース

Database	URL	Contents
★統合 Database 検索システム		
Entrez	www.ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/index.html	The Life Sciences Search Engine (包括的検索)
Gene	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=gene	A Searchable Database of Genes (遺伝子検索)
OMIM	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=omim	Online Mendelian Inheritance in Man (遺伝性疾患検索)
PubMed	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=PubMed	National Library of Medicine (文献検索)
DDBJ	www.ddbj.nig.ac.jp/	DNA Data Bank of Japan (包括的検索)
GenomeNet	www.genome.jp/	GenomeNet Database (包括的検索)
DBGET	www.genome.ad.jp/dbget/	A Database Retrieval System for Molecular Biology Databases (包括的検索)
KEGG	www.genome.ad.jp/kegg	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (代謝パスウェイ解析)
EMBL-EBI	www.ebi.ac.uk/services/	European Bioinformatics Institute Service (包括的検索)
InterPro	www.ebi.ac.uk/interpro	A Database of Protein Families, Domains and Functional Sites (モチーフ・ドメイン検索)
ExPASy	au.expasy.org	Expert Protein Analysis System Proteomics Server (プロテオーム解析)
LIPID BANK	lipidbank.jp/	Lipid Bank for Web Database (脂質検索)
GEO	www.ncbi.nlm.nih.gov/geo	Gene Expression Omnibus (マイクロアレイ解析)
dbSNP	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=snp	Single Nucleotide Polymorphism Database (SNP 解析)
HGMD	www.hgmd.cf.ac.uk/hgmd0.html	Human Gene Mutation Database (遺伝性疾患検索)
RefEXA	www.lsbm.org/database/index.html	Reference Database for Gene Expression Analysis (マイクロアレイ解析)
★配列解析・ホモロジー検索・系統樹作成		
FASTA	fasta.genome.jp/	Sequence Similarity Search (ホモロジー検索)
BLAST	blast.genome.jp	Sequence Similarity Search (ホモロジー検索)
UniProt	www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?uniprot	SWISS-PROT Protein Sequence Database (タンパク質配列解析)
PIR	www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?pir	PIR Protein Sequence Database (タンパク質配列解析)
CLUSTALW	align.genome.jp	Multiple Sequence Alignment (系統樹作成)
TraceSuite II	www-cryst.bioc.cam.ac.uk/~jije/evoltrace/evoltrace.html	Evolutionary Trace Server (系統樹作成)
PROSCAN	thr.cit.nih.gov/molbio/proscan	Web Promoter Scan (プロモーター解析)
★タンパク質立体構造解析		
PDB	www.rcsb.org/pdb	The RCSB Protein Data Bank (タンパク質立体構造検索)
RasMol	www.rcsb.org/pdb/help-graphics.html#rasmol_download	Molecular Graphics (タンパク質立体構造可視化)
GRASS	honiglab.cpmc.columbia.edu/cgi-bin/GRASS/surfserv_enter.cgi	Graphical Representation and Analysis of Structure Server (タンパク質立体構造検索)
SWISS-MODEL	swissmodel.expasy.org//SWISS-MODEL.html	An Automated Comparative Protein Modelling Server (相同モデリング解析)
ERRAT	nihserver.mbi.ucla.edu/ERRAT	A Protein Structure Verification Algorithm (タンパク質立体構造予測)
Verify3D	nihserver.mbi.ucla.edu/Verify_3D	A Crystal Structure Evaluation Server (タンパク質立体構造予測)
SCOP	scop.mrc-lmb.cam.ac.uk/scop/index.html	Structural Classification of Proteins (タンパク質二次構造分類)
DBAli	salilab.org/DBAli	A Database of Structure Alignments (立体構造類似性解析)
★タンパク質機能予測		
SOSUI	sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html	Classification and Secondary Structure Prediction of Membrane Proteins (膜貫通領域予測)
PSORT II	psort.ims.u-tokyo.ac.jp	Prediction of Protein Sorting Signals and Localization Sites in Amino Acid Sequences (細胞内局在予測)
SignalP 3.0	www.cbs.dtu.dk/services/SignalP	Prediction of Signal Peptide Cleavage Sites in Amino Acid Sequences (シグナルペプチド予測)
PredictProtein	www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html	Structure Prediction and Sequence Analysis (モチーフ・ドメイン検索)
Scansite	scansite.mit.edu	A Motif Scan (モチーフ解析)
BIND	www.bind.ca	The Biomolecular Interaction Network (タンパク質相互作用検索)
DIP	dip.doe-mbi.ucla.edu	Databases of Interacting Proteins (タンパク質相互作用検索)
MIPS	mips.gsf.de/proj/ppi/	The MIPS Mammalian Protein-Protein Interaction Database (タンパク質相互作用検索)
MINT	160.80.34.4/mint/index.php	A Molecular Interaction Database (タンパク質相互作用検索)
PubGene	www.pubgene.org/	Gene Database and Tools (バスウェイ解析)
PROCAT	www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PROCAT/PROCAT.html	A Database of 3D Enzyme Active Site Templates (酵素活性部位解析)
PhosphoSite	www.phosphosite.org/Login.jsp	An In Vivo Phosphorylation Site Database (リン酸化部位解析)

2005年11月のURLを示す。

osteopontin (OPN) 発現上昇を発見した¹¹⁾。彼らはラット実験的自己免疫性脳脊髄炎 (experimental autoimmune encephalomyelitis : EAE) 摘出脊髄の microarray 解析で, OPN の上昇を確認した。OPN は Th1 cytokine

であり, 遺伝子欠損マウスは EAE 惹起に対して抵抗性を示す¹¹⁾。Lock らは GeneChip を用いて MS 急性炎症性病巣と慢性非活動性病巣を比較し, 前者における G-CSF の上昇と後者における IgG Fc receptor, IgE

表2 MS免疫病態のマイクロアレイ解析

Authors	Reference no.	Year	Number of cases	Origin of samples
Whitney et al.	46	1999	PPMS (n=1)	acute lesion vs NAWM
Ramanathan et al.	27	2001	RRMS (n=15) vs HC (n=15)	monocyte-depleted PBMC
Wandinger et al.	41	2001	RRMS (n=1) plus HC (n=2)	PBMC incubated with IFN β <i>in vitro</i>
Whitney et al.	47	2001	PPMS (n=1), RRMS (n=1), EAE vs HC (n=3)	acute or chronic lesions of MS and EAE vs white matter of non-MS controls
Lock et al.	19	2002	CPMS and SPMS (n=4)	acute or chronic active lesions vs chronic silent lesions
Mass et al.	21	2002	RA (n=20), SLE (n=24), IDDM (n=5), and MS (n=5) vs HC before and after influenza vaccination (n=9)	PBMC
Bomprezzi et al.	9	2003	RRMS (n=18), SPMS (n=6) vs HC (n=21)	PBMC (fresh or frozen)
Graumann et al.	12	2003	SP/PP/RRMS (n=10) vs non-neurological controls (n=7)	NAWM vs control white matter
Koike et al.	15	2003	RRMS (n=13) before and at 3 and 6 months after IFN β treatment	T and non-T cells separated from PBMC
Mycko et al.	25	2003	SPMS (n=4)	chronic active vs silent lesions and the lesion margin vs center
Stürzbecher et al.	34	2003	RRMS before and after IFN β treatment for 6 months (n=10; 6 responders vs 4 non-responders)	frozen PBMC <i>ex vivo</i> or incubated with IFN β <i>in vitro</i>
Tajouri et al.	35	2003	SPMS (n=5) vs non-MS	acute and chronic active lesions
Weinstock-Guttman et al.	44	2003	RRMS before and at 1, 2, 4, 8, 24, 120, and 160 h after IFN β treatment (n=8)	monocyte-depleted PBMC
Achiron et al.	1	2004	RRMS (n=26; 14 with treatment) vs HC (n=18)	PBMC
Achiron et al.	2	2004	RRMS treated (n=13) vs untreated (n=13)	PBMC
Airla et al.	3	2004	RRMS (n=6) before and after IVMP	PBMC
Hong et al.	13	2004	RRMS/SPMS treated with IFN β (n=18), GA (n=12) or untreated (n=15)	PBMC
Iglesias et al.	14	2004	RRMS (n=17) vs HC (n=7)	PBMC
Lindberg et al.	18	2004	SPMS (n=6) vs non-neurological controls (n=12)	active lesions vs NAWM
Mandel et al.	22	2004	RRMS (n=13) vs SLE (n=5) vs HC (n=18)	PBMC
Mayne et al.	24	2004	RRMS (n=21) vs HC (n=19)	CD4 ⁺ T cells
Satoh et al.	31	2005	RRMS (n=65) plus SPMS (n=7) vs HC (n=22)	T and non-T cells separated from PBMC

Abbreviations: RRMS, relapsing-remitting MS; SPMS, secondary progressive MS; PPMS, primary progressive MS; CPMS, chronic progressive MS; HC, healthy controls; IDDM, insulin-dependent diabetes mellitus; NAWM, normal appearing white matter; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; IFN, interferon; GA, glatiramer acetate; IVMP, intravenous methylprednisolone pulse; up, upregulation; down, downregulation.

receptor, histamine receptor type 1 の上昇を認めた¹⁹⁾。
また G-CSF 投与で EAE が軽症化し, immunoglobulin

(Ig)FcR γ -chain 遺伝子欠損マウスでは EAE 慢性化が抑制されることを検証した¹⁹⁾。

Types of microarray	Number of genes on array	Key findings
cDNA microarray (original)	1,344 or 5,000	up (IRF-2, TNFRp75) in acute lesions
cDNA macroarray (GF211 ; Research Genetics)	5,184	up (LCK, IL-7R, MMP-19), down (CCR6, DFFA) in MS
cDNA microarray (Mini-Lymphochip)	6,432	up (CCR5, IP-10, IL15RA) by IFN β treatment
cDNA microarray (original)	2,798	up (5-lipoxygenase) in MS, EAE lesions
GeneChip (HuGene FL ; Affymetrix)	7,026	up (G-CSF) in active lesions, up (IgG FcR) in silent lesions
cDNA macroarray (GF211 ; Research Genetics)	4,329	down (apoptosis-regulatory genes) in autoimmune diseases
cDNA microarray (Modified Lymphochip)	6,500 or 7,500	up (PFAH1B1, IL-7R, ZAP70, CD27), down (HSP70, CKS2) in MS
cDNA macroarray (Human 1.2 ; Clontech)	3,528	up (HIF-1 α) in NAWM
cDNA microarray (Hitachi Life Science)	1,259	up (15 IFN-responsive genes) in MS by IFN β treatment
cDNA microarray (Human 1.0 ; Clontech)	588	up (immune-related genes) in the margin of active lesions
cDNA microarray (Mini-Lymphochip)	6,432 or 12,672	down (IL-8) in IFN β responders after treatment
cDNA microarray (original)	5,000	up (α B-crystallin, SOD) in acute lesions
cDNA macroarray (GF211 ; Research Genetics)	5,184	up (IFN-responsive genes) by IFN β treatment
GeneChip (Human U95 Av2 ; Affymetrix)	12,000	up (T cell activation genes), down (IL-1/TNF signaling genes) in MS
GeneChip (Human U95 Av2 ; Affymetrix)	12,000	up (SCYA4, IL2RG, Fas) by immunomodulatory treatment
cDNA macroarray (Human Hematology/ Immunology ; Clontech)	448	down (LCK, TCF7, CD5, ISGF3) by IVMP
cDNA macroarray (original)	36	distinct profiles between IFN β and GA treatment
GeneChip (HuGene FL ; Affymetrix)	6,800	up (E2F transcription factor pathway genes) in MS
GeneChip (Human U95 A ; Affymetrix)	12,633	up (Ig synthesis-related genes) in active lesions
GeneChip (Human U95 Av2 ; Affymetrix)	12,000	down (NR4 A1, NR4 A3) in autoimmune diseases
cDNA macroarray (Immune ; National Institute on Aging)	1,152	up (CYFIP2) in MS
cDNA microarray (Hitachi Life Science)	1,259	dysregulation of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in MS

Mycko らは cDNA microarray を用いて、SPMS 慢性活動性病巣と非活動性病巣、脱髄巣辺縁部と中心部を

比較し、活動性病巣辺縁部での免疫応答関連遺伝子群 (TNF α など) の上昇を報告した²⁵⁾。Graumann らは

cDNA microarray を用いて SPMS の NAWM における脳虚血関連遺伝子群 (HIF-1 α など) の上昇を認めた¹²⁾。Lindberg らは、GeneChip を用いて SPMS 活動性病巣での Ig 産生亢進を見出した¹⁸⁾。Tajouri らは cDNA microarray を用いて、SPMS 急性・慢性活動性病巣における α B-crystallin, SOD1 の上昇を認めた³⁵⁾。これら一連のマイクロアレイによる MS 脳組織の解析はサンプル数が少ないため、RNA 抽出部位が全体像を反映していない可能性を否定出来ない。

2. MS と健常者の末梢血リンパ球の遺伝子発現比較解析

Ramanathan らは cDNA microarray を用いて、MS と健常者の PBMC の遺伝子発現プロフィールを比較し、MS における lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (LCK), IL-7R の上昇を報告した²⁷⁾。LCK は Airla らにより cDNA microarray の解析で、RRMS の PBMC で IVMP 治療により低下する遺伝子として報告されている³⁾。Bomprezzi らは cDNA microarray を用いて、RRMS と健常者の PBMC で発現差異を呈する 53 遺伝子を同定した⁹⁾。MS で T 細胞活性化関連遺伝子群 IL-7R, ZAP70, TNFRSF7 (CD27) の上昇およびサイトカイン mRNA 分解制御因子 HSPA1A (HSP70) の低下を認めた。Mayne らは RRMS と健常者の末梢血 CD4 陽性 T 細胞を negative selection で分離、cDNA microarray を用いて解析し、MS における cytoplasmic FMR1 interacting protein 2 (CYFIP2) の上昇を報告した³⁴⁾。

筆者らは 72 例の IFN β 未治療活動性 MS (65 RRMS, 7 SPMS) と、22 名の健常者の末梢血から AutoMACS (Miltenyi Biotec) で CD3 陽性 T 細胞と CD3 陰性 non-T 細胞を分離した。各々の分画の遺伝子発現プロフィールを、アノテーションが明確な 1,259 遺伝子を掲載する cDNA microarray (Hitachi Life Science) を用いて解析した³¹⁾。両群間で T 細胞 173 遺伝子、non-T 細胞 50 遺伝子の発現差異を認めた。上位 30 遺伝子を選択すると、T 細胞 25 遺伝子 (NR4 A2, TCF8 上昇と MAPK1, SMARCA3, HSPA1A, TRAIL, TOP1, CCR5, BAG1, DAXX, TSC22, PARP 低下など)、non-T 細胞 27 遺伝子 (ICAM1, CDC42, RIPK2, SODD, TOP2A 上昇と BCL2, RPA1, NFATC3, HSPA1L, RBBP4, PRKDC 低下など) がアポトーシス制御遺伝子群に分類された。すなわち MS でアポトーシス促進遺伝子 (proapoptotic genes) と抑制遺伝子 (antiapoptotic genes) の発現上昇および低下の拮抗的バランス (counterbalance) を認めた。

Achiron らは 26 例の RRMS と 18 名の健常者の PBMC の遺伝子発現プロフィールを GeneChip で比較

解析した¹⁾。両群間で 1,109 遺伝子の発現差異を認め、MS において T 細胞活性化関連遺伝子群 (LEF1, TCF3, SLAMF, ITGB2, CTSE) の上昇と IL-1 β /TNF α シグナル伝達系遺伝子群の低下を認めた。しかし筆者らの結果³¹⁾に反して、MS での orphan nuclear receptor NR4 A2 発現低下を報告した。彼らの MS 14 例は、採血時に IFN β , glatiramer acetate (GA) または intravenous Ig (IVIg) を投与中であり、遺伝子発現に影響していた可能性がある。Achiron らは上記の症例を治療群 13 例と未治療群 13 例に分けて比較し、治療関連 7 遺伝子群 (TNFRSF6; Fas など) を同定した²⁾。また 13 例の RRMS と 5 例の SLE を 18 名の健常者と比較し、自己免疫特異的プロフィール (autoimmunity-specific signature) としてアポトーシス制御遺伝子群の発現異常を認めた²²⁾。Maas らは 20 例の RA, 24 例の SLE, 5 例の IDDM, 5 例の MS, 9 名のインフルエンザワクチン接種前後の健常者の PBMC を解析した²¹⁾。ワクチン誘導性免疫応答と自己免疫疾患のプロフィールは異なっていたが、RA と SLE 間、MS と IDDM 間は極めて類似していた。彼らも自己免疫疾患共通プロフィールとして、アポトーシス制御遺伝子群の発現低下を認めた。Iglesias らは RRMS と健常者の PBMC を GeneChip で比較解析し、MS における E2F 転写因子系遺伝子群の上昇を認め、E2F1 遺伝子欠損マウスでは EAE が軽症化することを証明した¹⁴⁾。

3. MS におけるインターフェロンベータ応答遺伝子の解析

筆者らは、ヒト胎児脳アストロサイト純培養で、cDNA microarray を用いて遺伝子発現プロフィールを解析し、IFN β による interferon-regulatory factor IRF-7 と pleiotrophin の上昇、IFN γ による IRF-1 と ICAM-1 の上昇を認めた³⁰⁾。Wandinger らは RRMS と健常者の PBMC を IFN β 存在下で培養し、cDNA microarray で解析した⁴¹⁾。彼らは IFN β による Th1 関連遺伝子 CCR5, IP-10 (CXCL10) の誘導を認めた。筆者らは 13 例の RRMS で IFN β 治療開始前・開始後 3 カ月・6 カ月に採血した。1,259 遺伝子 cDNA microarray を用いて、末梢血 CD3 陽性 T 細胞と CD3 陰性 non-T 細胞で、発現変動した遺伝子群 (IFN-responsive genes: IRG) を同定した¹⁵⁾。T 細胞で 8 遺伝子 (IRF-7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI60, IFI30, ATF3, TLR5) の上昇と IL-3, MIG の低下、non-T 細胞で 12 遺伝子 (IRF-7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI27, IFI17, TAP1, TNFAIP6, TSC22, SULT1C1, RPC39, RAB11A) の上昇、IL-3 の低下を認めた。ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI27, TSC22, SULT1C1 は治療開始後 3~6 カ月において持続的上昇

を認めた。一方、統計学的有意差はなかったが、治療後に Th1 関連遺伝子 CCR5 (T), IFN γ (T), TNF α (non-T) の上昇傾向を認めた。この所見は MS では IFN β 治療は必ずしも明確な Th2 shift を誘導しないという見解⁴¹⁾を支持する。上記のうち 9 遺伝子 (IRF-7, ISG15, IFI56, IFI6-16, IFI60, IFI17, TAP1, TNFAIP6, MIG) はプロモーター領域に IFN-stimulated response element (ISRE) や IRF element (IRF-E) が存在する既知 IRG で、治療に直接反応し誘導され、治療効果に深く関与していると考えられる。IRF-7 はウイルス感染時に IFN α/β 産生を増幅する正の制御因子である³⁶⁾。IFI30 は class II MHC 拘束性抗原提示の際働くチオール還元酵素で、遺伝子欠損マウスでは抗原提示能低下を来す²³⁾。TAP1 は class I MHC 拘束性抗原提示の際働くペプチド輸送因子で、遺伝子欠損マウスでは CD8⁺T 細胞による結核菌抵抗力が減弱する⁸⁾。TNFAIP6 は TNF α , IL-1 β により誘導される分泌蛋白質で抗炎症作用を呈する⁷⁾。すなわち IFN β は多彩な antiviral/antiinflammatory mediators を誘導することが明らかになった。興味深いことに、SLE では治療に関わらず PBMC における IRG 発現レベルが高い⁵⁾。

Weinstock-Guttman らは IFN β 治療前後の 8 例の RRMS の PBMC を経時的に解析し、IRG を同定した⁴⁴⁾。その多くは筆者らの報告^{15,48)}とオーバーラップしている。Liang らは Weinstock-Guttman らのデータをバイオインフォマティクス手法で再解析し、IRG は early-onset (within 8 時間), intermediate-onset (24 時間), late-onset (48 時間) の 3 群に分類されることを見出した¹⁷⁾。Stürzebecher らは IFN β 治療前後 10 例の RRMS の PBMC の遺伝子発現プロフィールを *ex vivo* 解析した³⁴⁾。治療前 6 カ月～開始後 12 カ月まで毎月 Gd 造影 MRI で活動性病巣数を算出、治療後病巣数が 60% 以上減少した症例を responder と定義した。また nonresponder を初めから効果のない nonresponder from initiation of therapy (INR) と、開始後一定期間は効果を認めたが、中和抗体 (neutralizing antibody: NAb) 出現により効果が減弱した nonresponder with development of NAb (NAbNR) の 2 群に分けた。さらに PBMC を IFN β 存在下で培養して *in vitro* 解析も行った。*Ex vivo* 解析では、治療後に responder で 25 遺伝子 (IFI17, OAS, Stat1 上昇と IL-8, CD69, c-fos, TSC22 低下など) が 2 倍以上変動し、このうち IL-8 発現低下は responder 識別の指標となることが示唆された。一方、*in vitro* 解析の IRG は 87 遺伝子で、responder, nonresponder 間で発現差異を認めなかった。筆者らは彼らの結果と反して、IFN β 治療後に TGF β -stimu-

lated protein (TSC22) の上昇を認めている¹⁵⁾。彼らの研究は症例数も少なく凍結保存した PBMC を解凍しており、実験操作が遺伝子発現に影響し得る。また 1 例の responder では治療前に約 90 個の造影病巣を呈しているが、これほど多数の造影病巣を示す MS は本邦では異例である。Hong らは IFN β 治療と GA 治療の MS 患者の PBMC を、免疫応答 36 遺伝子を載せた cDNA macroarray で解析し、治療反応性遺伝子群の相違を調べた¹³⁾。活性化 T 細胞の血液脳関門通過に重要な MMP-9 は IFN β により低下し、GA では上昇した。

van Boxel-Dezaire らは 26 例の IFN β 治療を受けた RRMS の PBMC で、サイトカイン遺伝子発現レベルを半定量的 RT-PCR 法により解析した³⁹⁾。治療前後 2 年間の再発回数・IVMP 回数・Extended Disability Status Scale (EDSS) スコアを集計して、16 例の responder と 10 例の nonresponder に分けると、responder は治療前に IL-12p35 発現レベルが低い特徴を呈した。Wandinger らは RRMS で IFN β 治療後 1 年間再発がなく、EDSS スコア悪化のみられない症例を responder, 再発した症例を nonresponder と定義した⁴²⁾。20 例の responder と 19 例の nonresponder を real-time RT-PCR 法と ELISA 法で解析すると、responder は TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL; TNFSF10) の発現が持続的高値を示すことを見出した。TRAIL は IRG の 1 つであり、遺伝子欠損マウスは胸腺細胞アポトーシス異常を来し、コラーゲン関節炎に高感受性になる¹⁶⁾。筆者らは MS の T 細胞における TRAIL 発現低下を報告している³¹⁾。Baranzini らは IFN β 治療中 52 例の RRMS の PBMC における 70 遺伝子の発現レベルを real-time RT-PCR で経時的に解析した⁶⁾。治療後 2 年間再発がなく EDSS スコア悪化のない症例を responder, 2 回以上再発した症例を nonresponder と定義した。両者は 3 遺伝子 (caspase2, caspase10, FLICE inhibitory protein; FLIP) の発現レベルの三次元マッピングで 86% 判別可能と報告した。

最近、筆者らは 72 例の IFN β 未治療活動性 MS (46 例は採血後 2 年間 IFN β 治療開始) と 22 名の健常者の末梢血 CD3 陽性 T 細胞を 1,259 cDNA microarray (Hitachi) で解析したデータ³¹⁾について、群間検定で有意な発現差異 (R 解析の Bonferroni 補正後 error rate < 0.25) を示す 286 遺伝子 (表 3) を選択して再解析した。この 286 遺伝子を指標遺伝子 (discriminator genes) として階層的クラスタ解析を施行し、データベース (MS classification database: MSCD) を樹立した。286 遺伝子は 5 クラス (class # 1-# 5) に分類された。また MS 群は健常者群から分かれ、さらに 4 サブグループ (A,

表3 MSと健常者で発現差異を呈する286遺伝子

Gene class	Gene symbol	Gene name	Functional category
Class 1	RGS14	Regulator of G protein signaling RGS14	Signal
	PTPN6	Protein-tyrosine phosphatase 1C, SHP-1	Signal
	E2F4	E2F transcription factor 4	TF
	COX15	Cytochrome c oxidase assembly protein COX15	Mitochondria
	TCFL1	YL-1 nuclear protein with DNA-binding ability	TF
	NHP2L1	Non-histone chromosome protein 2-like 1	TF
	HDGF	Hepatoma-derived growth factor	GF
	CSF1R	Macrophage colony stimulating factor I receptor, protooncogene c-fms	Cytokine
	IL6R	IL-6 receptor	Cytokine
	IL17R	IL-17 receptor	Cytokine
	EP300	p300 protein	TF
	TCF17	zinc finger protein 354 A, transcription factor 17	TF
	IFNAR1	IFN-alpha receptor	Cytokine
	CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator, I-FLICE	Apoptosis
	ITGB1	Integrin beta 1 (CD29)	Signal
	RBBP4	Retinoblastoma-binding protein 4	TF
	CDC10	CDC10 homolog	Cell cycle
	RBL2	Retinoblastoma-like protein 2	Signal
	JAK1	Janus kinase 1	Signal
	CCNC	Cyclin C	Cell cycle
	ATP2C1	Ca ⁺⁺ -sequestering ATPase	Signal
	PPP3CB	Calcineurin A2	Signal
	NFATC3	T cell transcription factor NFAT4c	TF
	PTPN7	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 7	Signal
SCYB5	Chemokine CXCL5, ENA-78	Chemokine	
ATP1B3P1	Na ⁺ /K ⁺ transporting ATPase, beta 3 pseudogene	Signal	
TNFRSF11A	Receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK)	Cytokine	
NPR2L	Candidate tumor suppressor gene 21, tumor suppressor candidate 4	Signal	
RAB9A	Small GTP binding protein Rab9	Signal	
TAF2D	TATA box binding protein-associated factor, RNA polymerase II, D	TF	
Class 2	MAPK1	Mitogen-activated protein kinase 1, ERK2	Signal
	RPC62	RNA polymerase III C	TF
	ABCD2	ATP-binding cassette, subfamily D (ALD), member 2	ABC transporter
	CYP21A2	Cytochrome P450, family 21, subfamily A, polypeptide 2	P450
	TGFBR1	Activin receptor-like kinase (ALK-5)	GF
	TCFL5	Transcription factor-like 5	TF
	CASP1	Caspase 1, IL1BCE	Apoptosis
	ABCE1	ATP-binding cassette, subfamily E (OABP), member 1, RNase L inhibitor	ABC transporter
	TPST2	Tyrosylprotein sulfotransferase-2	Enzyme
	GZMA	Granzyme A	Enzyme
	TNFSF10	TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)	Apoptosis
	P2Y5	Purinergic receptor P2Y5	Signal
	RUNX1	Runt-related transcription factor 1, AML1b protein	TF
	SCYB10	Chemokine CXCL10, IP-10	Chemokine
	EPHX2	Cytosolic epoxide hydrolase	Enzyme
	ABCG2	ATP-binding cassette, subfamily G (WHITE), member 2	ABC transporter
	HSP105B	Heat shock protein 105 kD	HSP
	RBL1	Retinoblastoma-like protein 1	Signal
	MYC	Oncogene c-myc	TF
	GNB5	G protein, beta 5	Signal
NR3C2	Nuclear receptor subfamily 3, group C, member 2 (MCR)	TF	
TXLNA	Taxilin alpha	Signal	
ABCF2	ATP-binding cassette, subfamily F (GCN20), member 2	ABC transporter	

表 3 続き

Gene class	Gene symbol	Gene name	Functional category
Class 2	ST13	Tumor suppressor ST13	Signal
	TCF21	Transcription factor 21, epicardin	TF
	ATP6B2	H ⁺ -transporting ATPase, lysosomal, V1 subunit B, isoform 2	Signal
	CREB1	cAMP responsive element binding protein 1	TF
	IFI16	IFN gamma-inducible protein 16	Cytokine
	PMS1	DNA mismatch repair protein PMS1	DNA
	HSPA1L	Heat shock 70 kD protein-like 1, HSP70-HOM	HSP
	HSPA10	Heat shock 70 kD protein 10 (HSC71)	HSP
	RAP1A	Ras-related protein (Krev-1)	Signal
	GNB1	G protein, beta 1	Signal
	MAP3K7	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7	Signal
	PTPRC	Leukocyte common antigen (CD45).	Signal
	POLR2G	RNA polymerase II G	TF
	AFG3L2	ATPase family gene 3-like 2	Signal
	RAB4	GTP-binding protein RAB4	Signal
	GNG10	G protein, gamma 10	Signal
	JUN	Oncogene jun	TF
	BAG1	Bcl-2-binding protein (BAG-1)	Apoptosis
	MAPKAPK3	Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3	Signal
	STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1	TF
	ARHGDI3	Rho GDP-dissociation inhibitor	Signal
	SELL	Selectin L	Signal
	CYP3A5P1	Cytochrome P450 pseudogene	P450
	CCND3	Cyclin D3	Cell cycle
	AKAP2	A kinase anchor protein 2	Signal
	M-RIP	myosin phosphatase-Rho interacting protein	Signal
	VAV2	Oncogene vav 2	Signal
	TTF1	transcription termination factor for RNA polymerase I	TF
	RBBP1	Retinoblastoma-binding protein 1	TF
	GABPB1	GA-binding protein transcription factor, beta subunit 1	Mitochondria
	IL18R1	IL-18 receptor 1	Cytokine
	CDC27	Cell division cycle 27	Cell cycle
ATP6D	H ⁺ -transporting ATPase, lysosomal, V1 subunit C, isoform 1	Signal	
TCF12	Transcription factor 12	TF	
TGFBR2	TGF beta receptor II	GF	
GSTM3	Glutathione transferase M3	Enzyme	
CSNK2A1	Casein kinase II alpha subunit	Signal	
MERTK	Protooncogene c-mer	Signal	
CSNK1A1	Casein kinase I alpha isoform	Signal	
Class 3	AGTRL2	Angiotensin receptor-like 2	Signal
	PRKCQ	Protein kinase C theta	Signal
	RPA1	Replication protein A1	DNA
	PDCD8	Apoptosis-inducing factor, programmed cell death 8	Apoptosis
	PRKDC	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	DNA
	MADH4	Mothers against dpp homolog 4 (SMAD4)	TF
	MX2	IFN-induced cellular resistance mediator protein (MxB)	Signal
	PECAM1	Platelet/endothelial cell adhesion molecule (CD31)	Signal
	VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM1)	Signal
	GNG2	G protein, gamma 2	Signal
	RALB	GTP-binding protein RALB	Signal
	RABGAP1	RAB GTPase activating protein 1	Signal
	CDC16	Cell division cycle 16 homolog	Cell cycle
PIM1	Oncogene pim-1	Signal	

表3 続き

Gene class	Gene symbol	Gene name	Functional category
Class 3	RAB7L1	RAB7, member RAS oncogene family-like 1	Signal
	BAK1	BCL2-antagonist/killer 1	Apoptosis
	SGK2	Serum/glucocorticoid regulated kinase 2	Signal
	TRA@	T-cell receptor alpha chain	Signal
	TGFB1	TGF-beta 1	GF
	PMM1	Phosphomannomutase 1	Enzyme
	CSNK2A2	Casein kinase II alpha prime subunit	Signal
	PLCB2	Phospholipase C-beta-2	Signal
	ERCC3	DNA repair helicase ERCC3	TF
	NFRKB	Nuclear factor related to kappaB binding protein	Signal
	CDK2	Cyclin-dependent kinase 2	Cell cycle
	ERBB2	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2	GF
	HRAS	v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	Signal
	SLC1A1	Solute carrier family 1, member 1, glutamate transporter EAAT3	Signal
	NBS1	Nijmegen breakage syndrome 1 (nibrin)	DNA
	IL2RG	IL-2 receptor gamma chain	Cytokine
	ATM	Ataxia telangiectasia mutated (ATM)	DNA
	CDC2L5	Cell division cycle 2-like 5	Cell cycle
	STIP1	Stress-induced-phosphoprotein 1	Signal
	ABCF1	ATP-binding cassette, subfamily F (GCN20), member 1	ABC transporter
	SPIB	Spi-B transcription factor	TF
	ADH2	Alcohol dehydrogenase 2 beta	Enzyme
	GNAQ	G protein, q polypeptide	Signal
	ABCB10	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 10	ABC transporter
	PAK2	p21-activated protein kinase 2	Signal
	STAC	Src homology three and cysteine rich domain	Signal
	ERBB4	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4	GF
	POLE2	DNA polymerase, epsilon 2	DNA
	CD79B	immunoglobulin-associated protein B29 (CD79B)	Signal
	ATP7A	Cu + + transporting ATPase, alpha polypeptide	Signal
ATP6S1	H+ transporting, ATPase, lysosomal, subunit 1	Signal	
EGF	EGF	GF	
AKAP9	A kinase anchor protein 9	Signal	
ABCC5	ATP-binding cassette, subfamily C (CFTR/MRP), member 5	ABC transporter	
Class 4	CHST2	Carbohydrate sulfotransferase 2	Enzyme
	ABCB7	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 7	ABC transporter
	HSPA1A	Heat shock 70 kD protein 1 (HSP70-1),	HSP
	CCR5	CC chemokine receptor 5	Chemokine
	DAXX	Death-associated protein 6	Apoptosis
	DOK1	Docking protein 1	Signal
	SMARCA3	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin	DNA
	MSH2	DNA mismatch repair protein MSH2, mutS homolog 2	DNA
	MAP2K1	Mitogen-activated protein kinase kinase 1	Signal
	TOPBP1	DNA topoisomerase II binding protein 1	DNA
	NR3C1	Glucocorticoid receptor	TF
	HSPCA	Heat shock 90 kD protein 1, alpha (HSP90 A)	HSP
	TAF2F	TATA box binding protein-associated factor, RNA polymerase II, F,	TF
	TSC22	TGF-beta-stimulated protein TSC22	TF
	AKR1B1	Aldo-keto reductase family 1, member B1, aldose reductase	Enzyme
	ADPRT	Poly (ADP-ribose) polymerase, PARP	Apoptosis
	HDAC1	Histone deacetylase 1	TF
	RAB11 A	RAB11 A, member RAS oncogene family	Signal
	TCEB1L	transcription elongation factor B, polypeptide 1-like (SKP1 A)	TF

表 3 続き

Gene class	Gene symbol	Gene name	Functional category
Class 4	PCNA	Proliferating cell nuclear antigen	Cell cycle
	ATP6H	H ⁺ -transporting ATPase, lysosomal, V0 subunit e	Signal
	IL16	IL-16	Cytokine
	TPR	Translocated promoter region to activated MET oncogene	Signal
	NTF5	Neurotrophin-4/5	GF
	MCM3	Minichromosome maintenance deficient 3	DNA
	IRS4	Insulin receptor substrate 4	Signal
	TP53BP1	Tumor protein p53 binding protein 1	Signal
	ADCY7	Adenylate cyclase 7	Signal
	MSH6	DNA mismatch repair protein MSH6, mutS homolog 6	DNA
	COX10	Cytochrome c oxidase assembly protein COX10	Mitochondria
	COX11	Cytochrome c oxidase assembly protein COX11	Mitochondria
	IL2RB	IL-2 receptor beta chain	Cytokine
	ATRX	Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked, RAD54	DNA
	AKAP11	A kinase anchor protein 11	Signal
	YWHAH	14-3-3 eta protein	Signal
	KRAS2	K-ras oncogene	Signal
	NKRF	NF-kappaB repressing factor	Signal
	POLR2H	RNA polymerase II polypeptide H	TF
	ING1	Growth inhibitory protein ING1 (p33)	Signal
	CDC25B	Cell division cycle 25B	Cell cycle
	CASP10	Caspase 10, MCH4	Apoptosis
	RASSF7	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 7	TF
	ABCB1	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 1	ABC transporter
	PSMC4	Proteasome 26S ATPase, subunit 4	Signal
	HSBP1	Heat shock factor binding protein 1	HSP
	ALDH9	Gamma-aminobutyraldehyde dehydrogenase	Enzyme
	CD2	T-cell surface antigen CD2	Signal
	EPOR	Erythropoietin receptor	Cytokine
	ABCB6	ATP-binding cassette, subfamily B (MDR/TAP), member 6	ABC transporter
	MST1R	Macrophage stimulating 1 receptor (RON)	Cytokine
	MADH2	Mothers against DPP homolog 2 (SMAD2)	TF
	TNFRSF1A	TNF receptor type 1.	Cytokine
	TIM	Rho guanine nucleotide exchange factor 5, oncogene tim	Signal
PSMC6	Proteasome 26S ATPase, subunit 6	Signal	
AP1S2	Adaptor-related protein complex 1, sigma 2 subunit	Signal	
ISGF3 G	IFN-stimulated transcription factor 3, gamma (p48)	TF	
PRKCBP1	Protein kinase C binding protein 1	Signal	
CRADD	CASP2 and RIPK1 domain containing adaptor with death domain	Apoptosis	
CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	Cell cycle	
IRF2	IFN regulatory factor-2	TF	
PRKCN	Protein kinase C, nu	Signal	
IL1RL1	IL-1 receptor-like 1	Cytokine	
SKIL	Ski-related oncogene snoN	Signal	
Class 5	NR4A2	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2 (Nurr1)	TF
	TNFAIP3	TNF alpha inducible protein A20	Signal
	GADD45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible protein GADD45 A	DNA
	TCF8	Transcription factor 8	TF
	ATF3	Activating transcription factor 3	TF
	SGK	Serum/glucocorticoid regulated kinase	Signal
	SCYA3	Chemokine CCL3, MIP1 A	Chemokine
	HBEGF	Heparin-binding EGF-like growth factor	GF
CDC42	Cell division cycle 42	Cell cycle	

表3 続き

Gene class	Gene symbol	Gene name	Functional category
	NFKBIE	I-kB epsilon	Signal
	NFKBIA	I-kB alpha	Signal
	FGF5	Fibroblast growth factor 5	GF
	PDGFRA	Platelet-derived growth factor receptor alpha	GF
	BRCA1	Breast and ovarian cancer susceptibility protein	Signal
	BAG4	BCL2-associated athanogene 4, silencer of death domains (SODD)	Apoptosis
	RIPK2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2	Apoptosis
	IFNA16	IFN alpha 16	Cytokine
	TNFAIP6	TNF alpha-induced protein 6	Signal
	CYP4B1	Cytochrome P450, family 4, subfamily B, polypeptide 1	P450
	CPE	Carboxypeptidase E	Enzyme
	TNFRSF10C	TRAIL receptor 3	Apoptosis
	DIRAS3	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 3	Signal
	THRB	Thyroid hormone receptor, beta	GF
	SULT4A1	Sulfotransferase family 4 A, member 1 (SULTX3)	Enzyme
	PRKCM	Protein kinase C, mu	Signal
	KITLG	c-kit ligand, stem cell factor	GF
	NR1I2	nuclear receptor subfamily 1, group I, member 2 (PXR)	TF
	CYP3A4	Cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 4	p450
	TFAP2C	Transcription factor AP-2 gamma	TF
	NR5A2	Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2 (B1F)	TF
	UGT2B4	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B4	Enzyme
	CRYBA4	Beta-A4 crystallin	Enzyme
	GHSR	Growth hormone secretagogue receptor, ghrelin receptor	GF
	IL10	IL-10	Cytokine
	PEMT	Phosphatidylethanolamine N-methyltransferase	Enzyme
Class 5	ILF1	Interleukin enhancer binding factor 1, forkhead box K2	TF
	CDK5R1	Cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)	Cell cycle
	ATP2B3	Ca ⁺⁺ transporting ATPase, plasma membrane 3	Signal
	CSF3	Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)	Cytokine
	TGFB2	TGF-beta-2	GF
	NR2F1	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1 (COUP-TFI)	TF
	MAPK13	Mitogen-activated protein kinase 13 (SAPK4, p38delta)	Signal
	AADAC	Arylacetamide deacetylase	Enzyme
	SCYA13	Chemokine CCL13, MCP4	Chemokine
	PNMT	Phenylethanolamine N-methyltransferase	Enzyme
	GNA13	G protein, alpha 13	Signal
	ALDH7	Aldehyde dehydrogenase 9 A1	Enzyme
	CYP1A2	Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 2	P450
	SCYA24	Chemokine CCL24, MPIF2	Chemokine
	TRAF4	TNF receptor-associated factor 4	Signal
	KARP1	Ku86 autoantigen related protein 1, DNA repair protein XRCC5	Signal
	CYP8B1	Cytochrome P450, family 8, subfamily B, polypeptide 1	P450
	CYP17	Cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1	P450
	IL12B	IL-12 p40	Cytokine
	ABL2	v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 2	Signal
	EGFR	EGF receptor	GF
	SCYB14	Chemokine CXCL14, BRAK	Chemokine
	TIMP3	Tissue inhibitor of metalloproteinase-3	Signal
	CYP2E	Cytochrome P450, family 2, subfamily E, polypeptide 1	P450
	MIG	Chemokine CXCL9, MIG	Chemokine
	CYP4F2	Cytochrome P450, family 4, subfamily F, polypeptide 2	P450
	GJB1	Gap junction protein, beta 1 (connexin 32)	Signal

表3 続き

Gene class	Gene symbol	Gene name	Functional category
Class 5	GNG3	G protein, gamma 3	Signal
	CYP2A6	Cytochrome P450, family 2, subfamily A, polypeptide 6	P450
	IGF2	Insulin-like growth factor II	GF
	NOVA1	Neuro-oncological ventral antigen 1, paraneoplastic Ri antigen	Signal
	THY1	Thy-1 cell surface antigen	Signal
	SCYA1	Chemokine CCL1, I-309	Chemokine
	NFKB2	NF-kB subunit p52/p100	Signal
	SCYA18	Chemokine CCL18, PARC	Chemokine
	CDC25A	Cell division cycle 25 A	Cell cycle
	TERF1	Telomeric repeat binding factor 1	DNA
	CES1	Carboxylesterase 1	Enzyme
	SLC6A2	Solute carrier family 6, member 2	Signal
	AVP	Arginine vasopressin	Signal
	POLR2J	RNA polymerase II, polypeptide J	TF
	SCYB2	Chemokine CXCL2, GRO2	Chemokine
SCYB1	Chemokine CXCL1, GRO1	Chemokine	
no class	TOP1	DNA topoisomerase I	DNA
	CHST4	Carbohydrate sulfotransferase 4	Enzyme
	SLC35A1	Solute carrier family 35, member 1	Signal
	ST1B2	Sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1	Enzyme
	TAF2H	TATA box binding protein-associated factor, RNA polymerase II, H	TF

72例のIFNβ未治療活動性MSと22名の健常者の末梢血CD3陽性T細胞の遺伝子発現解析で、両群間で有意な発現差異を示す286指標遺伝子を同定し、階層的クラスター解析を施行した。286遺伝子は分類不能の5遺伝子を除き、5クラス(class # 1-# 5)に分類された。Abbreviations: Signal, signal transduction; TF, transcription/translation factor/regulator; DNA; DNA damage/repair/replication regulator; GF, growth factor; HSP, heat shock protein.

B, C, D)に分類された⁴⁹⁾。A群は遺伝子発現プロフィールが最も健常者に類似し、B群は臨床的活動性が最も高く、chemokine遺伝子の集積したclass # 5の発現レベルが最も高く、C群は大脳限局病変を呈する患者が多く、D群はEDSSスコアが最も高値であった。また健常者とMS-A群を識別し得る58遺伝子を絞り込むことが出来た。IFNβ治療症例では、治療前後2年間の再発回数・IVMP日数・入院日数・EDSSスコア・MRI T2強調画像病巣数と治療満足度スコアを集計して、responderとnonresponderに分類すると、IFNβ responderはA群とB群に集積していた。Responderはnonresponderに比較して、治療開始後6カ月の時点のIRG(ISG15, IFI27, MCP-1, TNFRp75)の発現レベルが高値に維持されていた。

筆者らのデータベースの有用性を検証するため、新規11症例(2例のactive RRMS, 4例のstable RRMS, 2例のpossible MS, 1例の視神経炎, 2例の活動性慢性炎症性脱髄性多発神経炎)をMSCDに適合させると、数年間再発のないstable RRMSは、階層的クラスター解析により全例健常者群に分類された(図2)。一方、慢性炎症性脱髄性多発神経炎(chronic inflamma-

tory demyelinating polyneuropathy; CIDP)はMS-A群に分類された。MSCDを訓練セット(training set)として機械学習したSVM解析によっても、上記のグループ分類の正当性が支持された。症例数は少ないが、筆者らの結果は末梢神経抗原に対する自己免疫機序が関与するCIDPと、中枢神経抗原に対する自己免疫機序で発症するMSは、T細胞遺伝子発現プロフィールの類似性があり、CIDPはDNAマイクロアレイ解析だけではMSと鑑別出来ないことを示唆する。

おわりに

遺伝子アレイ解析は、臨床所見や画像のみでは鑑別困難な疾患の補助診断のツール、腫瘍悪性度や予後の予測、薬物反応性や副作用の予測、治療効果の判定など幅広い臨床応用が可能である。最近神経内科専門医施設を対象としアンケート調査を施行したところ、回答者の80%以上がDNA microarrayによるMS診断法やIFNβ治療効果予測法開発に期待感を持っていることが判明した⁵⁰⁾。今回筆者らはMSがT細胞遺伝子発現プロフィールに基づき4群に分類され、各群は疾患活動性・病変分布・IFNβ治療反応性と密接な対応を

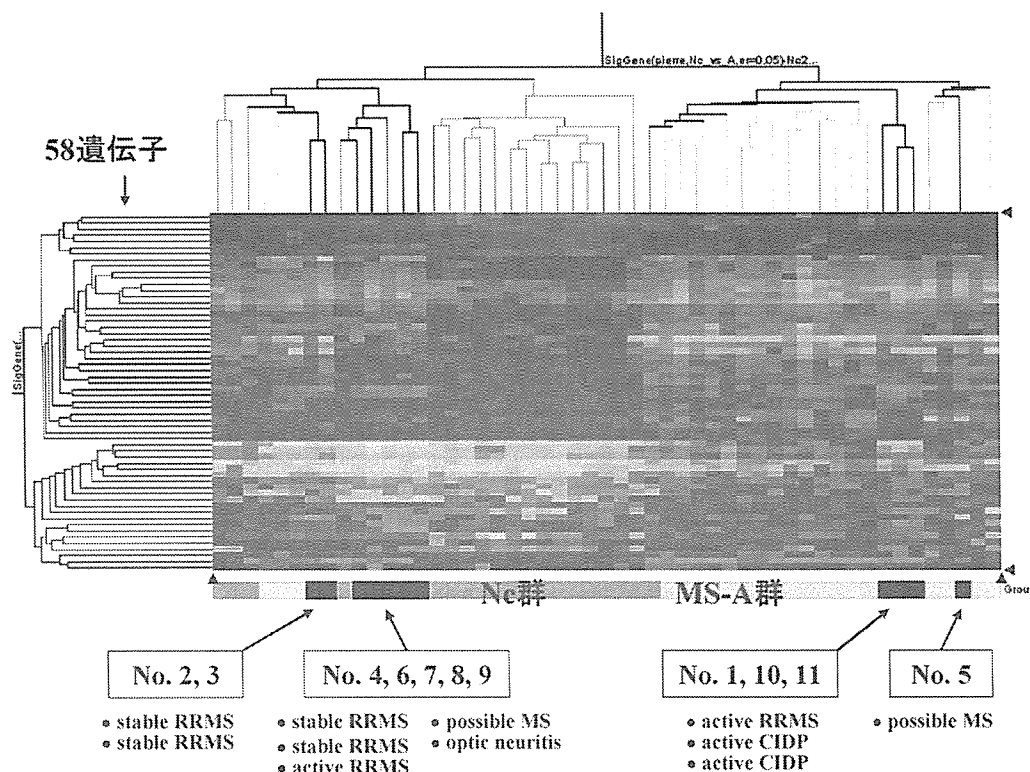


図2 階層的クラスター解析

未治療 MS (n=72) と健常者 Nc (n=22) の T 細胞を cDNA microarray (1,259 遺伝子) で解析し、発現差異を認められた 286 遺伝子(表 3)を指標遺伝子 (discriminator genes) として階層的クラスター解析を行い、データベース (MS classification database : MSCD) を樹立した。MS 群は Nc 群から分離され、さらに A, B, C, D の 4 群に分類された。A 群は遺伝子発現プロファイルが最も Nc 群に類似しており、群間検定で Nc と A を識別する 58 遺伝子を選択した。新規 11 症例 (2 例の active RRMS, 4 例の stable RRMS, 2 例の possible MS, 1 例の optic neuritis, 2 例の CIDP) を MSCD 適合させると、stable RRMS は全例 Nc 群に分類され、一方 CIDP は A 群に分類された。図は Nc 群と MS-A 群のクラスターを示す。

認めることを報告し、データベースを樹立した (MS classification database : MSCD)。今後 MSCD を礎にして MS テーラメイド医療樹立に向けて研究を進める予定である。

謝辞

本稿で紹介した研究は、国立精神・神経センター神経研究所免疫研究部山村 隆部長、古池史子先生、中西恵美先生、尾上祐行先生、土居芳充先生、南里悠介先生、佐藤和貴郎先生、荒浪利昌先生、および難治性疾患の画期的診断・治療法等に関する研究班の班員諸氏との共同研究でなされ、平成 17 年度厚生労働科学研究費補助金こころの健康科学 (遺伝子アレイによる多発性硬化症再発予測法樹立に関する研究 : H17-こころ-020) および平成 17 年度創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業 (DNA マイクロアレイによる多発性硬化症の迅速診断法の樹立に関する研究 : KH21101) の補助を受けた。

文献

- 1) Achiron A, Gurevich M, Friedman N, Kaminski N, Mandel M : Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis : unique gene expression of disease activity. *Ann Neurol* 55 : 410-417, 2004
- 2) Achiron A, Gurevich M, Magalashvili D, Kishner I, Dolev M, Mandel M : Understanding autoimmune mechanisms in multiple sclerosis using gene expression microarrays : treatment effect and cytokine-related pathways. *Clin Dev Immunol* 11 : 299-305, 2004
- 3) Airla N, Luomala M, Elovaara I, Kettunen E, Knuutila S, Lehtimäki T : Suppression of immune system genes by methylprednisolone in exacerbations of multiple sclerosis. Preliminary results. *J Neurol* 251 : 1215-1219, 2004
- 4) Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X,

- Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson JJr, Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM : Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403 : 503-511, 2000
- 5) Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, Shark KB, Grande WJ, Hughes KM, Kapur V, Gregersen PK : Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 : 2610-2615, 2003
 - 6) Baranzini SE, Mousavi P, Rio J, Caillier SJ, Stillman A, Villoslada P, Wyatt MM, Comabella M, Greller LD, Somogyi R, Montalban X, Oksenberg JR : Transcription-based prediction of response to IFN β using supervised computational methods. *PLoS Biol* 3 : e2, 2005
 - 7) Bárdos T, Kamath RV, Mikecz K, Glant TT : Anti-inflammatory and chondroprotective effect of TSG-6 (tumor necrosis factor- α -stimulated gene-6) in murine models of experimental arthritis. *Am J Pathol* 159 : 1711-1721, 2001
 - 8) Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR, Brenner MB : Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med* 189 : 1973-1980, 1999
 - 9) Bomprezzi R, Ringnér M, Kim S, Bittner ML, Khan J, Chen Y, Elkahloun A, Yu A, Bielekova B, Meltzer PS, Martin R, McFarland HF, Trent JF : Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls : identifying pathways relevant to disease. *Hum Mol Genet* 12 : 2191-2199, 2003
 - 10) Brown MP, Grundy WN, Lin D, Cristianini N, Sugnet CW, Furey TS, Ares MJr, Haussler D : Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 : 262-267, 2000
 - 11) Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, Sobel RA, Lock C, Karpuz M, Pedotti R, Heller R, Oksenberg JR, Steinman L : The influence of the proinflammatory cytokine osteopontin on autoimmune demyelinating disease. *Science* 294 : 1731-1735, 2001
 - 12) Graumann U, Reynolds R, Steck AJ, Schaeren-Wiemers N : Molecular changes in normal appearing white matter in multiple sclerosis are characteristic of neuroprotective mechanisms against hypoxic insult. *Brain Pathol* 13 : 554-573, 2003
 - 13) Hong J, Zang YCQ, Hutton G, Rivera VM, Zhang JZ : Gene expression profiling of relevant biomarkers for treatment evaluation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 152 : 126-139, 2004
 - 14) Iglesias AH, Camelo S, Hwang D, Villanueva R, Stephanopoulos G, Dangond F : Microarray detection of E2F pathway activation and other targets in multiple sclerosis peripheral blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol* 150 : 163-177, 2004
 - 15) Koike F, Satoh J, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T : Microarray analysis identifies interferon β -regulated genes in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 139 : 109-118, 2003
 - 16) Lamhamedi-Cherradi S-E, Zheng S-J, Maguschak KA, Peschon J, Chen YH : Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL^{-/-} mice. *Nature Immunol* 4 : 256-260, 2003
 - 17) Liang Y, Tayo B, Cai X, Kelemen A : Differential and trajectory methods for time course gene expression data. *Bioinformatics* 21 : 3009-3016, 2005
 - 18) Lindberg RLP, De Groot CJA, Certa U, Ravid R, Hoffmann F, Kappos L, Leppert D : Multiple sclerosis as a generalized CNS disease-comparative microarray analysis of normal appearing white matter and lesions in secondary progressive MS. *J Neuroimmunol* 152 : 154-167, 2004
 - 19) Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L : Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature Med* 8 : 500-508, 2002
 - 20) Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H : Heterogeneity of multiple sclerosis lesions : implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47 : 707-717, 2000
 - 21) Maas K, Chan S, Parker J, Slater A, Moore J, Olsen N, Aune TM : Cutting edge : molecular portrait of human autoimmune disease. *J Immunol* 169 : 5-9, 2002
 - 22) Mandel M, Gurevich M, Pauzner R, Kaminski N, Achiron A : Autoimmunity gene expression portrait : specific signature that intersects or differentiates between multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 138 : 164-170, 2004
 - 23) Maric M, Arunachalam B, Phan UT, Dong C, Garrett WS, Cannon KS, Alfonso C, Karlsson L, Flavell RA, Cresswell P : Defective antigen processing on GILT-free mice. *Science* 294 : 1361-1365, 2001
 - 24) Mayne M, Moffatt T, Kong H, McLaren PJ, Fowke KR, Becker KG, Namaka M, Schenck A, Barrdoni B, Bernstein CN, Melanson M : CYFIP2 is highly abundant in CD4⁺ cells from multiple sclerosis patients and is involved in T cell adhesion. *Eur J Immunol* 34 : 1217-1227, 2004
 - 25) Mycko MP, Papoian R, Boschert U, Raine CS, Selmaj KW : cDNA microarray analysis in multiple sclerosis lesions : detection of genes associated with disease activity. *Brain* 126 : 1048-1057, 2003
 - 26) Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturla LM, Angelo M, McLaughlin ME, Kim JY, Goumnerova LC, Black PM, Lau C, Allen JC, Zagzag D, Olson JM, Curran

- T, Wetmore C, Biegel JA, Poggio T, Mukherjee S, Rifkin R, Califano A, Stolovitzky G, Louis DN, Mesirov JP, Lander ES, Golub TR : Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 415 : 436-442, 2002
- 27) Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Nguyen LT, Badgett D, Miller C, Patrick K, Brownscheidle C, Jacobs L : *In vivo* gene expression revealed by cDNA arrays : the pattern in relapsing-remitting multiple sclerosis patients compared with normal subjects. *J Neuroimmunol* 116 : 213-219, 2001
- 28) Rudick RA, Lee J-C, Simon J, Ransohoff RM, Fisher E : Defining interferon β response status in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 56 : 548-555, 2004
- 29) Saida T, Tashiro K, Itoyama Y, Sato T, Ohashi Y, Zhao Z, the Interferon Beta-1b Multiple Sclerosis Study Group of Japan : Interferon beta-1b is effective in Japanese RRMS patients. A randomized, multicenter study. *Neurology* 64 : 621-630, 2005
- 30) Satoh J, Kuroda Y : Differing effects of IFN β vs IFN γ in MS. Gene expression in cultured astrocytes. *Neurology* 57 : 681-685, 2001
- 31) Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T : Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage-regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 18 : 537-550, 2005
- 32) Sospedra M, Martin R : Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23 : 683-747, 2005
- 33) Steinman L, Zamvil S : Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nature Rev immunol* 3 : 483-492, 2003
- 34) Strüzebecher S, Wandinger KP, Rosenwald A, Sathya-moorthy M, Tzou A, Mattar P, Frank JA, Staudt L, Martin R, McFarland HF : Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon- β in multiple sclerosis. *Brain* 126 : 1419-1429, 2003
- 35) Tajouri L, Mellick AS, Ashton KJ, Tannenber AEG, Nagra RM, Tourtellotte WW, Griffiths LR : Quantitative and qualitative changes in gene expression patterns characterize the activity of plaques in multiple sclerosis. *Mol Brain Res* 119 : 170-183, 2003
- 36) Taniguchi T, Takaoka A : The interferon- α / β system in antiviral responses : a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol* 14 : 111-116, 2002
- 37) The IFNB Multiple Sclerosis Study Group : Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 43 : 655-661, 1993
- 38) Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L : Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338 : 278-285, 1998
- 39) van Boxel-Dezaire AHH, van Trigt-hoff SCJ, Killestein J, Schrijver HM, van Houwelingen JC, Polman CH, Nagelkerken L : Contrasting response to interferon β -1b treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis : does baseline interleukin-12p35 messenger RNA predict the efficacy of treatment? *Ann Neurol* 48 : 313-322, 2000
- 40) Walther EU, Hohlfeld R : Multiple sclerosis : side effects of interferon beta therapy and their management. *Neurology* 53 : 1622-1627, 1999
- 41) Wandinger K-P, Strüzebecher C-S, Bielekova B, Detore G, Rosenwald A, Staudt LM, McFarland HF, Martin R : Complex immunomodulatory effects of interferon- β in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes. *Ann Neurol* 50 : 349-357, 2001
- 42) Wandinger K-P, Lünemann JD, Wengert O, Bellmann-Strobl J, Aktas O, Weber A, Grundström E, Ehrlich S, Wernecke K-D, Volk H-D, Zipp F : TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 361 : 2036-2043, 2003
- 43) Waubant E, Vukusic S, Gignoux L, Dubief FD, Achiti I, Blanc S, Renoux C, Confavreux C : Clinical characteristics of responders to interferon therapy for relapsing MS. *Neurology* 61 : 184-189, 2003
- 44) Weinstock-Guttman B, Badgett D, Patrick K, Hartrich L, Santos R, Hall D, Baier M, Feichter J, Ramanathan M : Genomic effects of IFN- β in multiple sclerosis patients. *J Immunol* 171 : 2694-2702, 2003
- 45) Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, Relman DA, Brown PO : Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 : 1896-1901, 2003
- 46) Whitney LW, Becker KG, Tresser NJ, Caballero-Ramos CI, Munson PJ, Prabhu VV, Trent JM, McFarland HF, Biddison WE : Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann Neurol* 46 : 425-428, 1999
- 47) Whitney LW, Ludwin SK, McFarland HF, Biddison WE : Microarray analysis of gene expression in multiple sclerosis and EAE identifies 5-lipoxygenase as a component of inflammatory lesions. *J Neuroimmunol* 121 : 40-48, 2001
- 48) Satoh J, Nanri Y, Tabunoki H, Yamamura T : Microarray analysis identifies a set of CXCR3 and CCR2 ligand chemokines as early IFN β -responsive genes in peripheral blood lymphocytes : an implication for IFN β -related adverse effects in multiple sclerosis *BMC Neurol* 6 : 18 online, 2006
- 49) Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Onoue H, Aranami T, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Saito T, Ohta M, Miyake S, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T : T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 174 : 108-118, 2006
- 50) 南里悠介, 佐藤準一, 佐藤和貴郎, 山村 隆 : DNA マイクロアレイによる多発性硬化症の診断とインター

Abstract

Microarray analysis classifies multiple sclerosis subgroups

Jun-ichi Satoh^{1,2)}

from

¹⁾ *Department of Immunology, National Institute of Neuroscience, NCNP, 4-1-1 Ogawahigashi, Kodaira, Tokyo 187-8502, Japan.*

²⁾ *Department of Bioinformatics and Neuroinformatics, Meiji Pharmaceutical University, 2-522-1 Noshio, Kiyose, Tokyo 204-8588, Japan.*

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) white matter mediated by an autoimmune process, whose development is triggered by a complex interplay of multiple genetic and environmental factors. MS shows a great range of heterogeneity in terms of the disease course, lesion distribution, therapeutic response to IFN β , and pathological aspects such as inflammation, antibody deposition, oligodendrocyte apoptosis, and axonal degeneration. These observations suggest that MS is a kind of neurological syndrome caused by different immunological mechanisms leading to the final common pathway that provokes inflammatory demyelination. DNA microarray technology is a novel approach to systematically monitoring the global expression of a large number of genes. It gives us new insights into the complexity of molecular interactions promoting the autoimmune process in MS. By microarray analysis followed by hierarchical clustering, we recently found that gene expression profiling of peripheral blood T lymphocytes discriminates four molecularly distinct subgroups of MS, associated with differential disease activity and therapeutic response to IFN β . These observations suggest that microarray analysis is valuable for designing and optimizing personalized treatment for heterogeneous populations of MS.

(Received : November 21, 2005)

Shinkei Kenkyu no Shinpo (Advances in Neurological Sciences), Vol. 50, No. 4, pp582-599, 2006.
IGAKU-SHOIN Ltd., Tokyo, Japan.

治療法の進歩—効果, 成績—

多発性硬化症

佐藤 準一

Interferon-beta therapy in multiple sclerosis

Jun-ichi Satoh

Department of Bioinformatics and Neuroinformatics, Meiji Pharmaceutical University

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) white matter mediated by an autoimmune process, whose development is triggered by a complex interplay of multiple genetic and environmental factors. Interferon-beta ($IFN\beta$) substantially reduces clinical exacerbation and MRI disease activity in MS, possibly by inhibiting the antigen-presenting capacity, by reversing a Th1 shift of the immune response, and by suppressing the transmigration of autoreactive T cells into the CNS. However, it has become evident that a significant number of MS patients do not well respond to $IFN\beta$ and experience adverse effects. Using a DNA microarray, we have recently identified a battery of IFN -responsive genes (IRG) in peripheral blood lymphocytes, which play a key role in biological effects of $IFN\beta$ in MS. They include IRF-7, a positive feedback regulator of $IFN\beta$ production, IFI30 and TAP1, a key component of the antigen-presentation machinery, and TNFAIP6, a secreted protein with antiinflammatory activities. Furthermore, $IFN\beta$ promptly induces proinflammatory chemokines and cytokines responsible for adverse effects in MS. Hierarchical clustering analysis of T cell gene expression profile discriminates four molecularly distinct subgroups of MS, associated with differential disease activity and therapeutic response to $IFN\beta$. A panel of IRG are upregulated persistently in $IFN\beta$ responders but not in nonresponders after treatment. These observations suggest that DNA microarray analysis is valuable for designing and optimizing personalized treatment of MS.

Key words: DNA microarray, hierarchical clustering analysis, interferon-responsive genes, multiple sclerosis, personalized medicine

はじめに

多発性硬化症 (multiple sclerosis: MS) は若年成人に好発する原因不明の中樞神経系炎症性脱

髓疾患で、視神経・大脳・脊髄など白質に脱髓巣が多発し、様々な神経症状が再発を繰り返して進行する難病である。1990年代以降に欧米・日本で実施された大規模臨床試験により、イン

明治薬科大学薬学部生命創薬科学科バイオインフォマティクス

0047-1852/06/¥40/頁/JCLS

ターフェロンベータ(interferon-beta: IFN β)のMS再発抑制効果が立証された¹⁻³⁾。現在ではMS急性増悪期には副腎皮質ステロイド短期間大量静脈内投与(intravenous methylprednisolone pulse: IVMP)、寛解・回復期にはIFN β の継続的皮下・筋肉内投与、または国内未承認薬アミノ酸ランダムポリマー copolymer-1 (glatiramer acetate: GA)の継続的皮下投与が、最も一般的治療法(first-line treatment)として選択されている。しかしIFN β が無効な症例(nonresponder)や副作用のため治療を継続できない症例も多い⁴⁻⁶⁾。現在までresponderとnonresponderの分子遺伝学的差異は解明されていない。nonresponderの存在はMSにおける個別化治療(individualized therapy)樹立の必要性を示唆する。

本稿ではMSにおけるIFN β 治療の経緯、効果発現機序、および遺伝子アレイを用いた個別化治療への試みに関して解説する。

1. MSの免疫病態

MS病巣では急性期にCD4⁺T細胞とマクロファージ(macrophages)を主体とするリンパ球浸潤と髄鞘形成細胞オリゴデンドロサイト(oligodendrocytes)の細胞死および脱髄(demyelination)を認める。回復期には髄鞘再生(remyelination)もみられるが、炎症が遷延化すると軸索変性(axonal degeneration)を来して不可逆的な後遺症を残す。MSの発症機序は解明されていないが、動物モデルの実験的自己免疫性脳脊髄炎(experimental autoimmune encephalomyelitis: EAE)からの類推で、MSでは脳炎惹起性自己抗原に分子相同性(molecular mimicry)を示す外来抗原(ウイルスなど)を認識し活性化したCD4⁺T helper type 1(Th1)細胞が、血液脳関門(blood-brain barrier: BBB)を通過し、中枢神経系に浸潤して発症が惹起されると推測されている(図1)。自己反応性Th1細胞は中枢神経系組織内でmacrophagesやミクログリア(microglia)により再度抗原提示を受けて再活性化され、Th1サイトカイン(IFN γ , IL-2, TNF β)を産生する。その結果macrophages/

microgliaが活性化され、炎症増強因子(TNF α , nitric oxide(NO), oxygen radicals)を大量に産生し、oligodendrocytesのアポトーシス(apoptosis)やネクローシス(necrosis)を誘導して脱髄が惹起される⁷⁾。一方、T helper type 2(Th2)細胞はTh2サイトカイン(IL-4, IL-5, IL-10, IL-13)を産生してTh1細胞の機能を抑制するが、MS急性増悪期にはTh1/Th2バランスがTh1優勢に偏倚している(Th1 shift)。自己反応性Th1細胞を制御する調節性細胞(regulatory cells)にはTh2細胞のほかに、CD4⁺CD25⁺T細胞、T helper type 3(Th3)細胞、T regulatory type 1(Tr1)細胞、natural killer(NK)細胞、NKT細胞があり、CD4⁺CD25⁺、Th3、Tr1はIL-10やTGF β を、NKはIL-5を、NKTはIL-4を産生してTh1細胞の機能を抑制する。

MSは多様な病態を呈する。臨床経過から再発寛解型(relapsing-remitting MS: RRMS)、2次進行型(secondary progressive MS: SPMS)、1次進行型(primary progressive MS: PPMS)に分類される。SPMSとPPMSでは軸索傷害・神経変性機序が病態進行に関与している。病巣分布からは中枢神経系全般に分布する脳型(conventional form: CMS)と視神経・脊髄に限局する視神経脊髄型(opticospinal MS: OSMS)に分類される。MS有病率は欧米人は50-200人/10万人、日本人は5-10人/10万人で、我が国では欧米に比較してOSMSの頻度が高い。

2. MSにおけるIFN β 治療の経緯

MSではウイルス感染を契機に再発が惹起されることが多いとの臨床経験に基づき、1981年にJacobsらは初めて天然型IFN β を抗ウイルス薬としてMS患者の髄液腔内に投与し治療効果を認めた⁸⁾。一方、1987年にPanitchらは組み換え型IFN γ をMS患者に静脈内投与した結果、再発を惹起した⁹⁾。1990年代に欧米で実施された大規模臨床試験(multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study)により、IFN β がRRMSやSPMSで再発頻度を約30%減少させ、Kurtzke's expanded disability status scale(EDSS)により評価された神経学的後遺

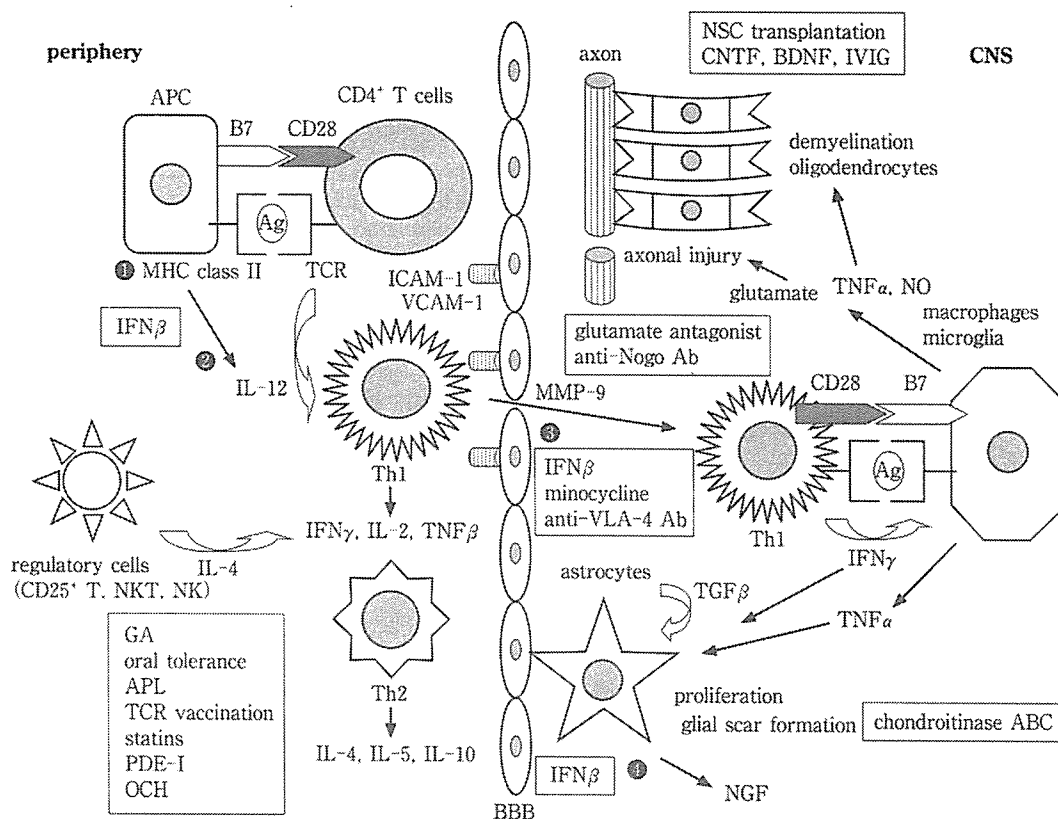


図1 多発性硬化症の発症機序とIFNβ治療効果発現部位

MSでは末梢(免疫系)で抗原提示を受けて活性化された自己反応性CD4⁺Th1細胞が血液脳関門(blood-brain barrier: BBB)を通過する。中枢神経系内でマクロファージ(macrophages)やミクログリア(microglia)により再度抗原提示を受けて、再活性化されTh1サイトカイン(IFN γ など)を産生する。その結果 macrophages/microgliaが活性化され、炎症増強因子(TNF α , nitric oxide(NO), glutamateなど)を大量に産生し、オリゴデンドロサイト(oligodendrocytes)が傷害されて脱髄(demyelination)が惹起される。IFN β は①IFN γ によるclass II MHC発現誘導に拮抗して抗原提示を抑制し、②抗原提示細胞のIL-12産生を抑制してTh1シフトを是正し、③活性化自己反応性T細胞のmatrix metalloproteinase-9(MMP-9)の産生を抑制してBBB通過を阻止し、④アストロサイト(astrocytes)による神経栄養因子(NGFなど)の産生を促進することにより、抗炎症作用と神経保護作用を呈する。MSに対する治療法(粋内; 研究段階のものを含む)の作用点を示す。

GA: glatiramer acetate, APL: altered peptide ligands, PDE-I: phosphodiesterase inhibitor, OCH: an altered glycolipid ligand named OCH, NSC: neural stem cells, CNTF: ciliary neurotrophic factor, BDNF: brain-derived neurotrophic factor, NGF: nerve growth factor, IVIG: intravenous immunoglobulins, Ab: antibody, Ag: self antigen.

症の進行を抑制し、MRI上の活動性病巣出現率を低下させることが立証された(表1)¹²⁾。すなわちIFN β がMSで初めてclass I evidenceに基づき有効性が立証された治療薬(disease-modifying agents: DMAs)として承認された。我が国における臨床試験でも欧米と同様な治療効果が確認された³⁾。更にMS予備群である

初発例(clinically isolated syndrome: CIS)で、IFN β 治療を開始するとclinically definite MSへの移行を抑制できることが明らかになり¹⁰⁾、早期治療開始の重要性が認識された。現在MSでは組み換え型ヒトIFN β 1b(商品名Betaferon[®], Betaseron[®])およびIFN β 1a(商品名Avonex[®], Rebif[®])が使用されている。IFN β 1bは大腸菌で